

氏名 曾 我 賢 彦

授与した学位 博士  
専攻分野の名称 歯学

学位授与の番号 博 甲 第 2309 号

学位授与の日付 平成 14 年 3 月 25 日

学位授与の要件 歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)

学位論文題名 TNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ 遺伝子の一塩基多型の研究  
—日本人歯周炎の重症化との関連性—

論文審査委員 教授 渡邊 達夫 教授 滝川 正春 教授 村山 洋二

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

## 【緒言】

炎症の場において産生される TNF- $\alpha$ あるいは IL-1 $\beta$ などの pro-inflammatory cytokine は、破骨細胞を活性化して骨吸収を促進したり、線維芽細胞の matrix metalloproteinase の産生を誘導することによって結合組織の破壊に関与する。したがって、TNF- $\alpha$ および IL-1 $\beta$  の産生性を規定する遺伝子多型は歯周病の発症あるいは進行を修飾する可能性がある。現在までのコーカシアンを対象とした TNF- $\alpha$ 遺伝子および IL-1 $\beta$ 遺伝子に関する研究において、TNF- $\alpha$ 遺伝子には転写開始点から-308 および-238 の部位に、IL-1 $\beta$ 遺伝子には+3953、-511 および-31 の部位に、それぞれの遺伝子がコードするサイトカインの産生性に関わる一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms: SNPs) が存在することが明らかにされ、IL-1 $\beta$  遺伝子 +3953 SNP については歯周病の重症化との関連においていくつかの報告も見る。しかしながら、SNPs のアレルの分布は人種間で異なることがあるので、この結果をそのまま日本人にあてはめることができるか否かについては不明である。

近年、日本人を対象とした TNF- $\alpha$ 遺伝子のプロモーター領域に関する研究によって、新たに-1031、-863、-857 SNPs が発見された。これらの SNPs は TNF- $\alpha$ の産生性に影響を及ぼすことが示唆されている。したがって、歯周病の病態をサイトカイン産生性から捉えようとするなら、TNF- $\alpha$ 遺伝子-1031、-863、-857 SNPs は歯周病の病態に関わる遺伝子多型として解明の対象となる。

本研究は、TNF- $\alpha$ および IL-1 $\beta$  の産生性を規定する遺伝子多型を整理し、重症の日本人歯周病患者が高頻度に有する SNPs のアレルを見出すことを目的とした。

## 【材料および方法】

## 1. 被験者

岡山大学歯学部附属病院第二保存科を受診した日本人重度歯周炎患者 64 名（男性 21 名、女性 43 名、50.5 $\pm$ 7.0 歳）と、歯周組織が臨床的に健康なう蝕治療中の患者および大学職員 64 名（男性 41 名、女性 23 名、42.6 $\pm$ 16.0 歳）計 128 名を被験者とした。これら被験者は問診で糖尿病などの歯周病の危険因子とされる全身疾患の既往がないものである。歯周病の診断は問診およびレントゲン診査で行い、1) 推定発症年齢が 35 歳以降、2) Schei らの記載にしたがって計測した歯槽骨の吸収度が 50 パーセント以上の歯を 6 歯以上有する患者を重度成人性歯周炎患者と診断した。

2. TNF- $\alpha$ および IL-1 $\beta$ 遺伝子の SNPs のアレルの判別

末梢血あるいは外科的治療の際に採取した歯肉組織片から InstaGene<sup>TM</sup> Whole Blood Kit (Bio-Rad Laboratories, CA, U.S.A.) あるいは QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (QIAGEN, CA, U.S.A.)を用いてゲノム DNA を調整した後、アレルの判別を polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法によって行った。対象とした SNPs は、TNF- $\alpha$ 遺伝子 -1031T/C、-863C/A、-857C/T、-308G/A、-238G/A SNPs および IL-1 $\beta$ 遺伝子 -511C/T、-31C/T、+3953C/T SNPs の計 8 箇所である。すべての SNPs について、

日本人健常者において頻度が高い前者をアリル1, 少ない後者をアリル2とした。PCRプライマーの設計は, TNF- $\alpha$ 遺伝子-857 SNPについてはKatoら, IL-1 $\beta$ 遺伝子-511 SNPについてはWilkinsonら, IL-1 $\beta$ 遺伝子+3953 SNPについてはPociotらの記載に従った。これら以外のSNPsについては, TNF- $\alpha$ 遺伝子についてはNedospasovら, IL-1 $\beta$ 遺伝子についてはBensiらの報告した塩基配列に従ってPCRプライマーを設計し, 目的のSNPの一方のアリルを認識する制限酵素で処理した。

### 3. LPS刺激した単球からのTNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ の産生量の測定

Molvigらの記載に従い, 健康な被験者15名(すべて男性, 29.7 $\pm$ 5.6歳)の末梢血から調整した個々の単球を*Escherichia coli* LPS (Sigma, MO, USA) 刺激下で培養し, 培養上清のTNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ 量をHuman TNF- $\alpha$ あるいはHuman IL-1 $\beta$  ELISA kit (ENDOGEN, MA, USA)を用いて測定した。

### 4. 統計処理

歯周病患者群と健常者群のアリル分布の比較にはカイ二乗検定を用いた。TNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ のアリル別産生量の比較にはマン・ホイットニー検定を用いた。これらの統計処理は統計ソフト「スタットフレックス」(アーテック, 大阪)または「スタットビュー」(SAS Institute Inc., Cary, NC, U.S.A)を用いて行った。

## 【結果】

### 1. TNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ 遺伝子のSNPsのアリル分布

TNF- $\alpha$ 遺伝子-308, -238 SNPs およびIL-1 $\beta$ 遺伝子+3953 SNPのアリル2キャリアの割合は, 重度歯周炎患者群および健常者群ともに8%以下であった。IL-1 $\beta$ 遺伝子-511, -31 SNPsのアリルは全被験者で同一であり, アリル2キャリアの割合は重度歯周炎患者群では84.4%, 健常者群では75.0%であった。TNF- $\alpha$ 遺伝子-1031, -863 SNPsのアリルは94.5%の被験者において一致し, アリル2キャリアは重度歯周炎患者群において35.9~39.1%, そして健常者群において21.9~25.0%存在した。TNF- $\alpha$ 遺伝子-857 SNPのアリル2キャリアは重度歯周炎患者群では39.1%, 健常者群においては28.2%存在した。

### 2. LPS刺激した単球のアリル別TNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ の産生性

LPS刺激した単球のTNF- $\alpha$ 産生性について, TNF- $\alpha$ 遺伝子-1031/-863, -857 SNPsアリル2キャリアの平均値はノンキャリアのそれより高い値を示した。しかし, 統計学的な有意差はなかった。一方, IL-1 $\beta$ の産生性は, IL-1 $\beta$ 遺伝子-511/-31 SNPsのアリル間でほぼ同程度であった。

### 3. TNF- $\alpha$ 遺伝子-1031, -863, -857 SNPsのいずれかがアリル2キャリアである者の割合

TNF- $\alpha$ 遺伝子-1031, -863, -857 SNPsのいずれかがアリル2キャリアである者の割合について, 重度歯周病患者群は健常者群より高い値を示した( $p=0.012$ )。

## 【考察】

IL-1 $\beta$ 遺伝子+3953 SNPは, コーカシアンで調べた研究から歯周病重症化に関係することが報告されている。しかしながら, 日本人を対象とした本研究では, このSNPでは健常者群および重度歯周炎患者群ともにアリル2キャリアの割合は8%未満と低く, 統計学的有意差はなかった。このことから, 日本人におけるこのSNPの歯周病重症化への関与は必ずしも高率に起こっているものではないと考えられた。

近年日本人で新たに発見されたTNF- $\alpha$ 遺伝子-1031, -863, -857 SNPsは, TNF- $\alpha$ の産生性に影響を与えることが示唆されている。TNF- $\alpha$ の産生性には, 女性ホルモンや, 局所の感染による細胞の生体内での初期活性化が影響する可能性がある。そこで, 本研究ではこれらの可能性を排除するため, 健康な男性のみを対象としてTNF- $\alpha$ の産生性を見た。その結果は過去の報告を支持するものであり, これらSNPsのアリル2は高産生性アリルであった。本研究によって, 日本人重度成人性歯周炎患者にTNF- $\alpha$ 高産生性アリルキャリアが多いという結果を得た。このことは, TNF- $\alpha$ 遺伝子-1031/-863, -857 SNPsアリル2はTNF- $\alpha$ の高産生性を介して歯周炎を重症化することを示唆するものである。

## 【結論】

TNF- $\alpha$ 遺伝子-1031, -863, -857 SNPsアリル2キャリアはTNF- $\alpha$ の産生性が高く, 日本人重度歯周炎患者ではこれらアリルのキャリアが高頻度にみられた。

## 論文審査結果の要旨

Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) はヒトゲノムにおいて最も頻度の高い多型であり、各個人の遺伝的背景を個別化するのに最適であると考えられている。歯周病においても、SNPs は疾患感受性を遺伝子レベルで捉えるための研究課題となっている。

本研究は、TNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$  遺伝子を対象として、重症の日本人歯周病患者が高頻度に有する SNPs のアリルが存在するかどうかを調べ、それらアリルの歯周病の重症化への関わりを検討することを目的としたものである。

得られた結果は次の通りである。1) 日本人において、TNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ 遺伝子に存在する SNPs の個々のアリル分布は、重度歯周炎患者群と健常者群の間に有意な違いはない。 2) TNF- $\alpha$ 遺伝子 -1031, -863, -857 SNPs およびIL-1 $\beta$ 遺伝子-511, -31 SNPs のアリル2 キャリアは、重度歯周炎患者群および健常者群に拘らず日本人に広く分布する。 3) TNF- $\alpha$ 遺伝子 -1031/-863, -857 SNPs およびIL-1 $\beta$ 遺伝子 -511/-31 SNPs のアリル間では、TNF- $\alpha$ あるいはIL-1 $\beta$ の産生性に統計学的な有意差は無い。 4) TNF- $\alpha$ 遺伝子 -1031, -863, -857 SNPs のいずれかがアリル2である者の割合は、重度歯周炎患者群が健常者群より高い。

これらの結果から、TNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ 遺伝子に存在する SNPs と日本人における歯周病重症化との関わりを示唆した。すなわち、それら SNPs の個々は歯周病の重症化を規定するものではないが、TNF- $\alpha$ 遺伝子 -1031/-863, -857 SNPs のいずれかがアリル2である者に重症の歯周病患者が多いことを示した。

以上によって、本申請論文は学位論文として価値があると認めた。